

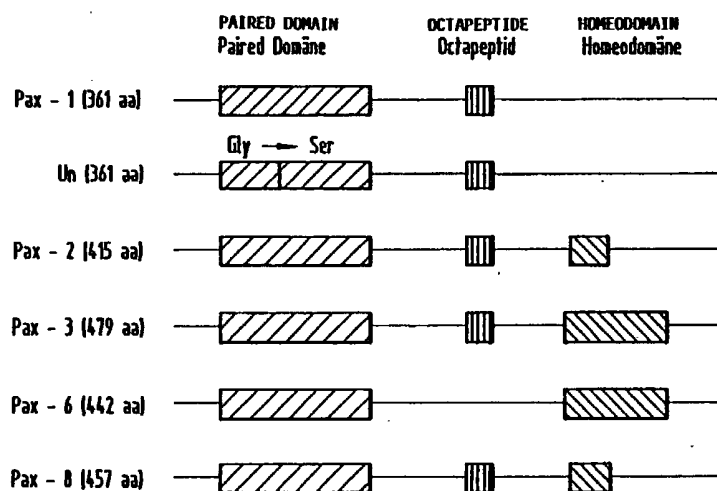
PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : A61K 37/02, 39/395, C07K 15/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/03196 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 1994 (17.02.94)
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02051 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. August 1993 (02.08.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 25 569.4 3. August 1992 (03.08.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstr. 10, D-37073 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : GRUSS, Peter [DE/DE]; Hainbundsstraße 9, D-37085 Göttingen (DE). MAULBECKER, Catharina [DE/CH]; Hofstraße 114, CH-8044 Zürich (CH). </div> <div style="width: 50%;"> (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstraße 9, D-81679 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> </div> </div>		

(54) Title: NEW TUMOR DIAGNOSING OR THERAPEUTICAL PROBE

(54) Bezeichnung: NEUE SONDE ZUR TUMORDIAGNOSTIK ODER TUMORTHERAPIE



(57) Abstract

A therapeutical or diagnosing agent contains as active substance at least one nucleic acid which hybridises with a pax gene, or atleast a pax protein, or at least one antibody against a pax protein or one of its derivatives. These agents are used for diagnosing and/or treating tumors, and also as antisense nucleic acids for inhibiting gene expression.

(57) Zusammenfassung

Ein erfindungsgemäßes therapeutisches oder diagnostisches Mittel enthält als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure, die mit einem Pax-Gen hybridisiert, oder mindestens ein Pax-Protein, oder mindestens einen Antikörper gegen ein Pax-Protein oder ein Derivat davon. Die erfindungsgemäßen Mittel finden Verwendung in der Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie sowie als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Neue Sonde zur Tumordiagnostik oder Tumorthherapie

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues therapeutisches oder diagnostisches Mittel, das als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, und insbesondere zur Diagnose oder/und Therapie von Tumoren geeignet ist.

Proteine, die eine Homöobox enthalten, spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von vielzelligem differenziertem Gewebe. Man nimmt an, daß die transkriptionale Regulation durch die Homöoboxproteine die genaue räumliche und zeitliche Abfolge von Wachstum und Differenzierung in dem sich entwickelnden Embryo koordiniert. Aus der Literatur (siehe z.B. K. Kongsuwan, J.M. Adams, Nucleic Acids Res. 17 (1989), 1881-1891; C. Blatt, D. Aberdam, R. Schwartz, L. Sachs, EMBO J. 7 (1988), 4283-4290; C. Blatt, Cancer Cells 2 (1990), 186-189; T.H. Rabbitts Cell 647 (1991), 641-644; A.W. Sasaki, J. Daskow, C.L. Macleod, M.B. Rodgers, L.J. Goudas, M.F. Wilkinson, MOD34 (1991), 155-164) ist bekannt, daß einige Homöobox-enthaltende Gene mit der Onkogenese in Zusammenhang stehen.

Eine Multigenfamilie, die ein gemeinsames konserviertes Sequenzmotiv, die "Paired"-Box aufweist, steht ebenfalls mit der Entwicklungskontrolle und der Gewebespezifität in verschiedenen Organismen im Zusammenhang. Die von der "Paired"-Box kodierte "Paired"-Domäne stellt eine DNA-bindende Domäne dar (J. Treisman, E. Harris, C. Desplan, Genes.Dev. 5 (1991), 594-604; G. Chalepakis, R. Fritsch, H. Fickenscher, O. Deutsch, M. Goulding, P. Gruss, Cell 66 (1991), 873-884) und wurde in verschiedenen Organismen, wie etwa Drosophila, Maus,

Schildkröte, Zebrafisch, Nematoden und Menschen identifiziert. Ein Zusammenhang der "Paired"-Domäne mit der Onkogenese war bisher nicht bekannt.

In der medizinischen Forschung werden große Anstrengungen auf die Bereitstellung neuer therapeutischer und diagnostischer Mittel im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren unternommen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung eines neuen Mittels, das insbesondere zur Diagnose und Therapie von Tumoren geeignet ist.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung eines Mittels zur Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Wirksubstanz, die

- (a) mindestens eine Nukleinsäure, die mit einem Pax-Gen hybridisiert,
- (b) mindestens ein Pax-Protein, oder/und
- (c) mindestens einen Antikörper gegen ein Pax-Protein oder ein Derivat davon enthält,

gegebenenfalls mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- und Verdünnungsmitteln formuliert.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Pax-Proteine, d.h. Proteine, welche die "Paired"-Domäne enthalten, die Onkogenese fördern können und somit als neue Gruppe von starken Onkoproteinen klassifiziert werden können, welche die Zellproliferation, das Verankerungs-unabhängige Wachstum und die Angiogenese induzieren. Es wurde festgestellt, daß mit Pax-Genen transformierte Zellen alle klassischen Malignitätsmerkmale, wie z.B. Kontaktinhibierung im "Focusassay", Wachstum in Weichagar und Tumorinduzierung in der Nacktmaus zeigten.

Das erfindungsgemäße therapeutische oder diagnostische Mittel kann somit als molekulare Sonde in der Tumordiagnostik eingesetzt werden, da die Verwendung einer Nukleinsäure, die mit einer für ein Pax-Protein kodierenden Nukleotidsequenz hybridisiert, eine qualitative und quantitative, zell- und gewebespezifische Bestimmung der Expression des jeweiligen Pax-Gens ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Mittel ist jedoch auch als Antisense-Nukleinsäure zur spezifischen Hemmung der Expression von Genen, welche die Pax-Sequenz enthalten, und somit auch als therapeutisches Mittel geeignet.

Ein erfindungsgemäßes Mittel muß zum diagnostischen Nachweis oder/und zur therapeutischen Behandlung mindestens eine Nukleinsäure enthalten, welche eine Bindung mit einem Pax-Gen eingeht. Vorzugsweise hybridisiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure unter "stringenten Bedingungen" an ein Pax-Gen. Stringente Bedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind als solche Bedingungen definiert, die eine selektive und nachweisbare spezifische Bindung der Nukleinsäure an ein bestimmtes oder mehrere Pax-Gene oder Pax-Transkripte ermöglichen. Eine derartige Hybridisierung unter stringenten Bedingungen bedeutet vorzugsweise, daß nach einer Hybridisierung bei 68°C in einer wäßrigen Lösung oder bei 42°C in 50 % Formamid und anschließendem Waschen des Filters bei 65°C in einer wäßrigen Lösung noch eine Bindung der Sonde an das Pax-Gen oder die Pax-RNA nachweisbar ist. Bei Verwendung von kürzeren Nukleinsäuren als Sonden kann es jedoch erforderlich sein, weniger drastische Hybridisierungs- oder/und Waschbedingungen zu verwenden.

Das erfindungsgemäße therapeutische oder diagnostische Mittel enthält vorzugsweise als Wirksubstanz mindestens eine Nu-

kleinsäure, die (a) die für ein Pax-Protein kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende (siehe oben) Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

Wenn gewünscht wird, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäure aus einem konservierten Bereich des Pax-Gens, d.h. aus der für die "Paired"-Domäne kodierenden Nukleotidsequenz stammen soll, verwendet man vorzugsweise eine Nukleinsäure, die (a) eine für die Aminosäuren 1 bis 74 einer "Paired"-Domäne kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform für den obigen Zweck enthält das erfindungsgemäße Mittel mindestens eine Nukleinsäure, die (a) eine für die Aminosäuren 5 bis 19, 35 bis 41, 68 bis 74, 95 bis 100 oder/und 115 bis 120 einer "Paired"-Domäne kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

Die voranstehend genannte Nomenklatur der Aminosäuren richtet sich dabei nach der Arbeit Walther et al., Genomics 11 (1991), 424-434, insbesondere Figur 2, die hiermit durch Bezugnahme zu einem Teil der Beschreibung wird.

Wenn es jedoch erforderlich ist, ein einziges Pax-Gen spezifisch nachzuweisen oder zu hemmen, wird man zweckmäßigerweise

eine Nukleinsäure mit einer Nukleotidsequenz aus einem nicht-konservierten Bereich des jeweiligen Gens verwenden, d.h. vorzugsweise aus dem nicht für die "Paired"-Domäne kodierenden Bereich.

Das erfindungsgemäße Mittel enthält eine Nukleinsäure, die aus einem beliebigen Pax-Gen stammt. Beispiele für geeignete Pax-Gene sind Pax-1 (Deutsch et al., Cell 53 (1988), 617-625), Pax-2 (Dressler et al., Development 109 (1990), 787-795; Nornes et al., Development 109 (1990), 797-809), Pax-3 (Goulding et al., EMBO J. 10 (1991), 1135-1147), Pax-4, Pax-5 und Pax-6 (Walther et al. (1991), supra), Pax-7 (Jostes et al., MOD 33 (1990), 27-38), Pax-8 (Plachov et al., Development 110 (1990), 643-651), HuP1, HuP2, HuP48 (Burri et al., EMBO J. 8 (1989), 1183-1190), prd, BSH4 und BSH9 (Bopp et al., Cell 47 (1986), 1033-1040) und Pox neuro und Pox meso (Bopp et al., EMBO J. 8 (1989), 3447-3457). Die oben genannten Literaturstellen werden durch Bezugnahme zu einem Teil der Beschreibung. Besonders bevorzugt sind menschliche Pax-Gene.

Die Nukleinsäure in dem erfindungsgemäßen Mittel ist - je nach Erfordernis - vorzugsweise eine unmodifizierte oder modifizierte DNA oder RNA. Auch die Länge der Nukleinsäure richtet sich nach dem jeweiligen Anwendungsgebiet.

Bei Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels als molekulare Sonde in der Tumordiagnostik handelt es sich vorzugsweise um eine DNA-Sonde mit einer Länge von 10 bis 100 Nukleotiden, vorzugsweise 12 bis 50 Nukleotiden. Weiterhin ist es bevorzugt, daß die Nukleinsäure eine radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung trägt, die zum Nachweis der Bindung an ein Pax-Gen dient.

Bei Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression handelt es sich vorzugsweise um eine RNA, die gegebenenfalls modifizierte Basen enthalten kann, um ihre Stabilität im Körper gegenüber einem Abbau durch Ribonukleasen zu erhöhen.

Die Anwendung des erfindungsgemäßen Mittels als molekulare Sonde oder/und als therapeutisches Mittel zur Hemmung der Genexpression erfolgt auf eine dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannte Weise.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein therapeutisches oder diagnostisches Mittel, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Wirksubstanz mindestens ein Pax-Protein enthält. Das Pax-Protein ist vorzugsweise aus der Gruppe, bestehend aus Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-4, Pax-5, Pax-6, Pax-7, Pax-8, HuP1, HuP2, HuP48, prd, BSH4, BSH9, Pox neuro und Pox meso ausgewählt. Die Aminosäuresequenz dieser Proteine ist aus den oben genannten Veröffentlichungen ersichtlich, die in Zusammenhang mit der Nukleinsäuresequenz genannt worden sind. Besonders bevorzugt sind menschliche Pax-Proteine.

Das Mittel wird vorzugsweise in der Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie verwendet.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein therapeutisches oder diagnostisches Mittel, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Wirksubstanz mindestens einen Antikörper gegen ein Pax-Protein enthält. Bevorzugt sind Antikörper, die gegen ein oder mehrere Pax-Proteine aus der Gruppe bestehend aus Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-4, Pax-5, Pax-6, Pax-7, Pax-8, HuP1, HuP2, HuP48, prd, BSH4, BSH9, Pox neuro und Pox meso gerichtet sind. Besonders bevorzugt sind Antikörper gegen menschliche Pax-Proteine.

Die erfindungsgemäßen Antikörper sind vorzugsweise monoklonale Antikörper, die auf bekannte Weise nach der Köhler-Millstein-Methode durch Immunisierung eines Versuchstieres, vorzugsweise einer Maus, mit dem entsprechenden Pax-Protein oder/und einem Gemisch von Pax-Proteinen, Gewinnung von Antikörper-produzierenden B-Zellen oder Milzzellen aus dem immunisierten Versuchstier und anschließender Fusionierung der Antikörper-produzierenden Zellen mit einer geeigneten Leukämiezelle zur Erzeugung von Hybridomen erhältlich sind. Beispiele für geeignete Antikörper sind Pax-1, Pax-2- und Pax-6-Antikörper (Abb.2).

Die erfindungsgemäßen Antikörper können vorzugsweise in vitro oder/und in vivo als Mittel in der Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie verwendet werden. Dabei können die Antikörper auch als Fragmente (z.B. Fab oder F(ab)₂ Fragmente) und gegebenenfalls gekoppelt an eine nachweisbare Gruppe (Enzym, Fluoreszenzmarker, radioaktiver Marker, Kernresonanzmarker etc.) oder an ein Toxin (z.B. Rizin, Diphtherietoxin etc.) verwendet werden. Die Herstellung derartiger Antikörper-Derivate erfolgt auf eine dem Fachmann auf dem Gebiet der Immunologie bekannte Weise (z.B. durch kovalente Kopplung über einen bi-funktionellen Linker).

Das folgende Beispiel dient in Verbindung mit Abb. 1 und 2 zur weiteren Veranschaulichung der Erfindung.

Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau der untersuchten Pax-Proteine Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-6 und Pax-8 sowie des mutagenisierten Pax-Proteins Un.

Abb. 2 zeigt Westernblots von Pax-Protein exprimierenden Zellextrakten nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern und enzymatischem Nachweis der Antikörper-Protein-Bindung.

Beispiel

1. Untersuchte Pax-Proteine

Es wurde die Wirkung der Proteine Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-6 und Pax-8 sowie einem mutagenisierten Pax-Protein (Un) untersucht. In Abbildung 1 ist die schematische Struktur dieser Pax-Proteine gezeigt. Die konservierten Domänen innerhalb der Proteine sind als Balken gezeigt, die auch ihre annähernden Positionen innerhalb der offenen Leserahmen angeben. Pax-1 ist das einzige Pax-Protein, von dem ein vollständiges Fehlen der Homöodomäne bekannt ist. Pax-3 und Pax-6 enthalten vollständige Homöodomänen zusätzlich zur "Paired"-Domäne. Beide DNA-Bindungsmotive sind durch mindestens 100 Aminosäuren voneinander getrennt. Die Proteine Pax-2 und Pax-8 enthalten nur 23 Aminosäuren der α -Helix der Homöodomäne. Die Punktmutation von G zu A in dem für das Un-Protein kodierenden Gen ist durch den resultierenden Austausch von Gly nach Ser gekennzeichnet. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind für Pax-1 bei Deutsch et al. (Cell 53 (1988), 617-625), für Pax-2 bei Dressler et al. (Development 109 (1990), 787-795), für Pax-3 bei Goulding et al. (EMBO J. 10 (1991), 1135-1147), für Pax-6 bei Walther und Gruss (Development 113 (1991), 1435-1439) und für Pax-8 bei Plachov et al. (Development 110 (1990), 643-651) offenbart.

2. Transformationstest

Die Pax-cDNAs wurden in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pCMV5 (Anderson et al., J.Biol.Chem. 264 (1989), 8222-8229) inseriert. Diese Konstrukte wurden zusammen mit pGKneo als selektierbarer Marker (Soriano et al., Cell 64 (1991), 693-702) in 208- und NIH 3T3-Zellen kotransfiziert. Die 208-Zellen wurden in DMEM (Biochrome) und Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (Boehringer Mannheim) kultiviert. Die NIH

3T3-Zellen wurden in DMEM mit 5 % neugeborenem Kälberserum (Boehringer Mannheim) kultiviert. 2 µg des jeweiligen pCMV-Pax-Expressionsplasmids wurden zusammen mit 1 µg pGKneo und 7 µg Träger-DNA auf 70 % konfluenten Einzelzellschichten einer 100 mm Gewebekulturplatte unter Verwendung der Calciumphosphatmethode mit Modifikationen (Weber und Schaffner, Nature 315 (1984), 75-77) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde für 2 bis 4 Wochen abhängig vom Anfang der Focusbildung stehengelassen. Danach wurden die Zellen mit einigen Tropfen Glutaraldehyd (Sigma) und mit 1 % Methylenblau (Sigma) in Wasser angefärbt. Die Gewebekulturplatten wurden mit Wasser gespült und die Foci gezählt.

Ein weiteres Drittel der Zellen wurde entweder in 0,6 %, 0,9 % oder 1,2 % Weichagar ausgesät, wie bei Fidler et al., Anticancer Res. 11 (1991), 17-24 beschrieben ist. Das verbleibende Drittel wurde zur DNA-Aufnahme durch Zugabe von G418 (Gibco) 24 Stunden nach dem Schock für die Zellen ausgewählt. Bei den 208-Zellen wurden 0,4 mg/l und bei den NIH 3T3-Zellen 0,6 mg/ml G418 zugesetzt. Die morphologisch transformierten Foci wurden gepickt und danach kultiviert. Diese Zellisolate wurden durch kontinuierliche Inkubation im Selektionsmedium vermehrt und für die Expressionsanalyse und die Transformationstests verwendet.

3. Ergebnisse der Transformationstests

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse einer Transformation von 208-Zellen mit Pax-Proteinen gezeigt. Die linke Spalte listet die DNAs auf, die in die Zellen eingeführt wurden. pCMV bedeutet Zellen, die nur das pCMV-Konstrukt als negative Kontrolle enthalten, pSV ist das als positive Kontrolle verwendete T-Antigen (SV40-Virus) Expressionskonstrukt. Die verschiedenen pCMV-Pax-Expressionskonstrukte sind durch den

Namen des Pax-Proteins angegeben, das sie exprimieren. Das Wachstum der Zellen wurde in 0,6 %, 0,9 % und 1,2 % Weichagar getestet. Die Zellkolonien wurden 2 bis 3 Wochen nach dem Plattieren gezählt. Die Experimente wurden für jeden Zelltyp mindestens 2 mal durchgeführt. + bedeutet Wachstum in Weichagar. - bedeutet kein Wachstum. +- bedeutet widersprechende Ergebnisse in zwei Experimenten.

Die nächste Spalte listet auf, ob die entsprechenden transformierten Zellen in der Lage waren, bei Vermischen mit normalen 208-Zellen eine Focusbildung zu induzieren oder nicht. Dieses Mischexperiment wurde 2 mal ausgeführt.

Die letzte Spalte zeigt die Anzahl von injizierten Nacktmäusen und die Anzahl von Injektionen, die zu einer Tumorbildung führten. Männliche nackte NMRI Mäuse wurden hierzu subkutan in der Flanke im Alter von 4 Wochen mit $1 \text{ bis } 5 \times 10^5$ transformierten Zellen injiziert. Die Zellen wurden vor der Injektion trypsinisiert und 2 x mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen, um stimulierende Effekte aus dem Serum auszuschließen. Die Tiere wurden für maximal 3 Monate auf einer wöchentlichen Basis auf die Bildung von Tumoren untersucht.

Tabelle 1

Transfizierte DNA	Weichagar-Test			Focus- test	Tumorigenizität Anzahl von Injektio- nen/Anzahl von Tumo- ren in Nacktmäusen
	0,6%	0,9%	1,2%		
pCMV	++	--	--	-	5/0
pSV	++	++	++	+	6/6
Pax-1	++	++	++	+	6/6
Un	++	--		-	6/1
Pax-2	++	++	++	+	6/6
Pax-3	++	++	++	+	6/6
Pax-6	++	++	++	+	6/4
Pax-8	++	++	++	+	6/6

Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen das onkogene Potential der Pax-Gene bzw. der "Paired"-Domäne. Bei dem Test, der die unterschiedlichen Pax-Proteine exprimierenden Klone in Weichagar mit unterschiedlichen Konzentrationen zeigt, kann das Wachstum der ansteigenden Weichagarkonzentrationen mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Tumoren in Beziehung gesetzt werden. Zellen, die nur den pCMV-Expressionsvektor enthielten, zeigten bei 0,6 % Weichagar und mehr kein Wachstum. Zellen, die das Pax-1-, Pax-2-, Pax-3-, Pax-6- bzw. Pax-8-Protein exprimierten, konnten hingegen bei Konzentrationen bis zu 1,2 % Weichagar wachsen. Ein Wachstum in diesem halbfesten Medium zeigt, daß die Pax-Proteine den Zellen die Fähigkeit zum Verankerungs-unabhängigen Wachstum verleihen. Das mutierte Un-Protein war zu einer vollständigen Transformation dieser Zellen nicht in der Lage, wie durch das Fehlen

von Verankerungs-unabhängigem Wachstum bei höheren Weichagar-Konzentrationen ersichtlich ist.

Die durch Injektion von pCMV-Pax-Expressionskonstrukten erzeugten Tumore wurden durch Standard in situ Hybridisierungsprotokolle (Goulding, EMBO J. 10 (1991), 1135-1147) analysiert. Die Zellen in den Pax-Tumoren sind spindelförmig. Die Tumore sind gut mit Gefäßen versorgt und zeigen eine starke extrazelluläre Matrixproduktion. Alle Tumore waren fest und verkapselt.

Weiterhin wurde ein Methylenblau-Test durchgeführt, um die Fähigkeit der Zellen zur Überwindung der Kontakthemmung zu bestimmen. Dieser Test wurde 2 mal in unbehandelten Zellen nach Transfektion durchgeführt. Zellen, welche die transformierende DNA aufgenommen haben, sind in der Lage, nicht transformierte Zellen zu überwachsen, was in dunkel markierten Zellfoci resultiert. In den mit Pax-Genen transformierten Zellen wurden - wie in der positiven Kontrolle mit pSV - die Bildung von Zellfoci beobachtet, während in den mit der negativen Kontrolle pCMV transformierten Zellen und in den nicht transformierten Zellen (208- und NIH 3T3-Zellen) deutlich weniger Foci sichtbar waren.

Die Ergebnisse des Weichagar-Tests stehen mit dem Auftreten von stark gefärbten Foci im Methylenblau-Test bei 208- und NIH 3T3-Zelltransfektionen unter Verwendung von Pax-Proteinen, die funktionelle "Paired"-Domänen enthalten, und der Tumorentstehung in der Nacktmaus im Einklang.

4. Immunologischer Nachweis der Pax-Expression in transfizierten Zellen

Aus den nach Punkt 2 transfizierten NIH 3T3- und 208-Zellen wurden nach bekannten Protokollen (Balling et al., Cell 55, (1988), 531-535) Gesamtzellextrakte hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 50 µg der Zellextrakte auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Immobilon-P-Membran durch halbtrockenen elektrischen Transfer überführt. Die Membran wurde in 5 % Trockenmilchpulver/phosphatgepufferter Salzlösung blockiert und über Nacht mit einer 1:200-Verdünnung der jeweiligen Pax-Antikörper inkubiert und mit der Peroxidase/Diaminobenzidin-Reaktion entwickelt (Balling et al., Supra). Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß Antikörper gegen Pax-1, Pax-2, Pax-3 und Pax-6 eine Reaktion mit den entsprechenden transfizierten Zellen zeigten. Der Pax-2-Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion mit Pax-8 und ermöglichte eine Bestätigung der Pax-8-Expression mit den jeweiligen Zellextrakten (nicht dargestellt). Das Molekulargewicht der Pax-Proteine wurde durch Vergleich mit dem Regenbogen-Proteinmarker (Amersham) bestimmt. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine ist in kD angegeben. Sowohl 208- als auch NIH 3T3-Zellextrakte enthielten etwa ähnliche Mengen der jeweiligen Pax-Proteine pro 50 µg Zellextrakt. Dies zeigt an, daß der CMV-Promotor in beiden Zelllinien gleichermaßen gut funktioniert. Der Westernblot von Pax-1 zeigt, daß Pax-1 und das mutierte Un-Protein in etwa gleichen Mengen exprimiert werden. Ein weiterer Zellextrakt, der durch Transfektion von Zellen mit einem pSV40 Promotor/Pax-1-Konstrukt hergestellt worden war, enthielt noch höhere Mengen des Pax-Proteins. In allen Fällen zeigten die Westernblots, daß mit pCMV transfizierte Kontrollzellen sehr viel weniger oder keine nachweisbaren Mengen an Protein erzeugten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Mittels zur Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Wirksubstanz, die
 - (a) mindestens eine Nukleinsäure, die mit einem Pax-Gen hybridisiert,
 - (b) mindestens ein Pax-Protein, oder/und
 - (c) mindestens einen Antikörper gegen ein Pax-Protein oder ein Derivat davon enthält,gegebenenfalls mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- und Verdünnungsmitteln formuliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die mit einem Pax-Gen hybridisiert.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) die für ein Pax-Protein kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) eine für die Aminosäuren 1 bis 74 einer "Paired"-Domäne kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und

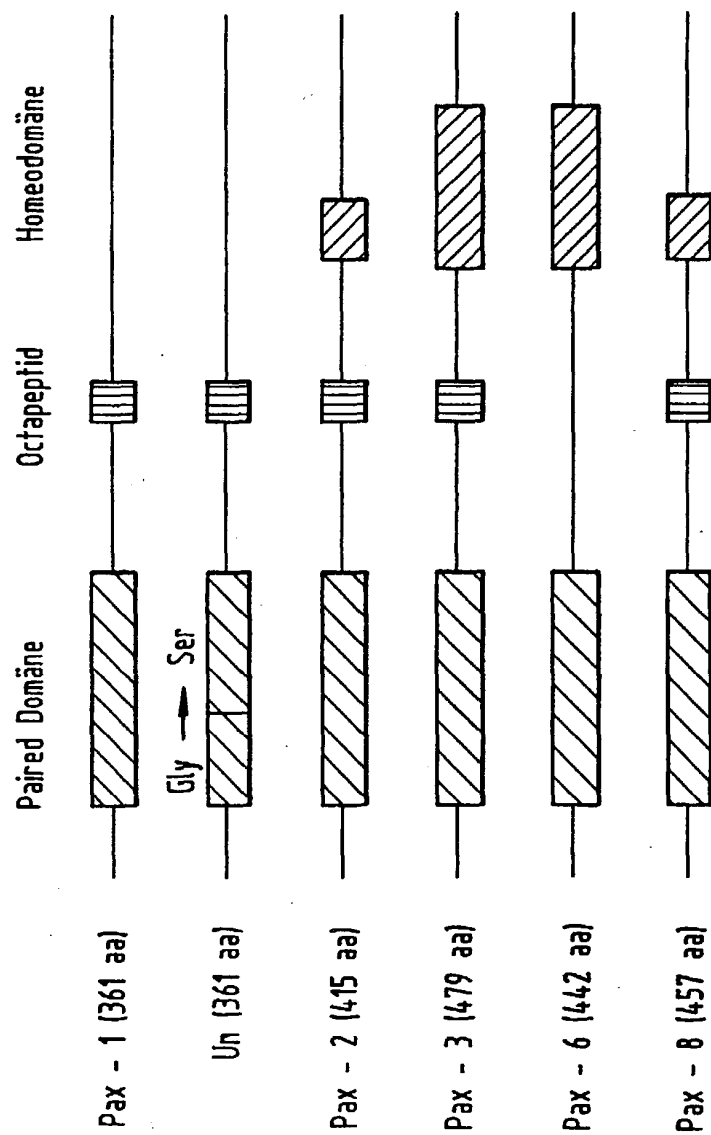
(b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß das Mittel mindestens eine Nukleinsäure enthält, die
(a) eine für die Aminosäuren 5 bis 19, 35 bis 41, 68 bis 74, 95 bis 100 oder/und 115 bis 120 einer "Paired"-Domäne kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil davon,
(c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleinsäure aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.
6. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß das Mittel Nukleotidsequenzen aus dem nicht-konser-
vierten Bereich eines Pax-Gens enthält.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß das Mittel mindestens eine Nukleinsäure enthält, die
Nukleotidsequenzen eines Pax-Gens, aus der Gruppe der
Gene, bestehend aus Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-4, Pax-5,
Pax-6, Pax-7, Pax-8, HuP1, HuP2, HuP48, prd, BSH4, BSH9,
Pox neuro und Pox meso, enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Nukleinsäure eine DNA ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäure eine gegebenenfalls modifizierte
RNA ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9 als moleku-
lare Sonde in der Tumordiagnostik.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9 als Anti-
sense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression.
12. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel als Wirksubstanz mindestens ein Pax-Pro-
tein enthält.
13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel mindestens ein Pax-Protein aus der Grup-
pe, bestehend aus Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-4, Pax-5,
Pax-6, Pax-7, Pax-8, HuP1, HuP2, Hup48, prd, BSH9, Pox
neuro und Pox meso, enthält.
14. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Mittel als Wirksubstanz mindestens einen Anti-
körper gegen ein Pax-Protein oder ein Derivat davon
enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper gegen ein oder mehrere Pax-Proteine
aus der Gruppe, bestehend aus Pax-1, Pax-2, Pax-3, Pax-
4, Pax-5, Pax-6, Pax-7, Pax-8, HuP1, HuP2, Hup48, prd,
BSH9, Pox neuro und Pox meso gerichtet ist.

16. Verfahren zur Diagnostik oder/und Therapie von Tumoren,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man eine Wirksubstanz, die
- (a) mindestens eine Nukleinsäure, die mit einem Pax-Gen
hybridisiert,
 - (b) mindestens ein Pax-Protein, oder/und
 - (c) mindestens einen Antikörper gegen ein Pax-Protein
oder ein Derivat davon enthält,
- verwendet.

Fig. 1



2/2

45
46
56

208 Pax - 1

208 Un

208 CMV

3T3 Pax - 1

3T3 Un

3T3 CMV

3T3 Pax - 2

3T3 CMV

208 CMV

208 Pax - 2

208 Pax - 3

208 CMV

3T3 Pax - 3

3T3 CMV

208 CMV

208 Pax - 6

3T3 CMV

3T3 Pax - 6

Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 93/02051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K37/02 A61K39/395 C07K15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 13, 29 March 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 117821q, see abstract & BIOCHEM. SOC. TRANS. vol. 20, no. 1, 1992 page 29S J.M. FEATHERSTONE ET AL. 'ISOLATION OF A GENE FROM XENOPUS BOREALIS CONTAINING A PAIRED BOX.' --- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 1993

Date of mailing of the international search report

2.12.93

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/02051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEDLINE AN=92001534 (KARLSRUHE) & MECH. DEV. vol. 31, no. 1, March 1991 pages 29 - 41 OPSTELTEN DJ. ET AL. 'THE MOUSE HOMEBOX GENE, S8, IS EXPRESSED DURING EMBRYOGENESIS PREDOMINANTLY IN MESENCHYME.'	1-16
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 89, no. 11, February 1992, WASHINGTON US pages 1179 - 1183 G. R. DRESSLER ET AL 'PAX-2 IS A DNA-BINDING PROTEIN EXPRESSED IN EMBRYONIC KIDNEY AND WILMS TUMOR.' see page 1180, column 1 - column 2 see page 1182, column 2 - page 1183, column 1	1-16
Y	DATABASE MEDLINE US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US AN=92120664 see abstract & GENOMICS vol. 11, no. 2, October 1991 pages 424 - 434 C. WALTHER ET AL. 'PAX: A MURINE MULTIGENE FAMILY OF PAIRED BOX- CONTAINING GENES.'	1-16
Y	WO,A,91 09974 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 11 July 1991 see claims	1-16
P,A	WO,A,92 13949 (ROUSSEL-UCLAF) 20 August 1992 see claims	1-16
P,A	NATURE vol. 360, no. 6399, 5 November 1992, LONDON GB pages 87 - 89 S. KRAUSS ET AL. 'ZEBRAFISH PAX {B} IS INVOLVED IN THE FORMATION OF THE MIDBRAIN-HINDBRAIN BOUNDARY.' see page 87; figure 1	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 93/02051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9109974	11-07-91	AU-B- 639532	29-07-93
		AU-A- 7140691	24-07-91
		EP-A- 0507868	14-10-92
		JP-T- 5504476	15-07-93
<hr/>			
WO-A-9213949	20-08-92	FR-A- 2672616	14-08-92
		FR-A- 2675156	16-10-92
		AU-A- 1360392	07-09-92
		EP-A- 0529033	03-03-93
<hr/>			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02051

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 5 A61K37/02 A61K39/395 C07K15/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 5 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 13, 29. März 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 117821q, siehe Zusammenfassung & BIOCHEM. SOC. TRANS. Bd. 20, Nr. 1, 1992 Seite 295 J.M. FEATHERSTONE ET AL. 'ISOLATION OF A GENE FROM XENOPUS BOREALIS CONTAINING A PAIRED BOX.' --- -/--	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Dezember 1993

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

22.12.93

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MEDLINE AN=92001534 (KARLSRUHE) & MECH. DEV. Bd. 31, Nr. 1, März 1991 Seiten 29 - 41 OPSTELTEN DJ. ET AL. 'THE MOUSE HOMEBOX GENE, S8, IS EXPRESSED DURING EMBRYOGENESIS PREDOMINANTLY IN MESENCHYME.'	1-16
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA Bd. 89, Nr. 11, Februar 1992, WASHINGTON US Seiten 1179 - 1183 G. R. DRESSLER ET AL 'PAX-2 IS A DNA-BINDING PROTEIN EXPRESSED IN EMBRYONIC KIDNEY AND WILMS TUMOR.' siehe Seite 1180, Spalte 1 - Spalte 2 siehe Seite 1182, Spalte 2 - Seite 1183, Spalte 1	1-16
Y	DATABASE MEDLINE US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US AN=92120664 siehe Zusammenfassung & GENOMICS Bd. 11, Nr. 2, Oktober 1991 Seiten 424 - 434 C. WALTHER ET AL. 'PAX: A MURINE MULTIGENE FAMILY OF PAIRED BOX- CONTAINING GENES.'	1-16
Y	WO,A,91 09974 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 11. Juli 1991 siehe Ansprüche	1-16
P,A	WO,A,92 13949 (ROUSSEL-UCLAF) 20. August 1992 siehe Ansprüche	1-16
P,A	NATURE Bd. 360, Nr. 6399, 5. November 1992, LONDON GB Seiten 87 - 89 S. KRAUSS ET AL. 'ZEBRAFISH PAX {B} IS INVOLVED IN THE FORMATION OF THE MIDBRAIN-HINDBRAIN BOUNDARY.' siehe Seite 87; Abbildung 1	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02051

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9109974	11-07-91	AU-B- 639532	29-07-93
		AU-A- 7140691	24-07-91
		EP-A- 0507868	14-10-92
		JP-T- 5504476	15-07-93
WO-A-9213949	20-08-92	FR-A- 2672616	14-08-92
		FR-A- 2675156	16-10-92
		AU-A- 1360392	07-09-92
		EP-A- 0529033	03-03-93